



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 077 588** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **C 12 P 13/02**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 96100024/13, 16.01.1996

(46) Дата публикации: 20.04.1997

(56) Ссылки: Заявка ЕПВ N 0204555, кл. C 12 P 13/02, 1986.

(71) Заявитель:

Государственное унитарное предприятие
Саратовский научно-исследовательский
институт биокатализа,
Саратовский филиал
Научно-исследовательского института химии и
технологии полимеров им.акад.В.А.Каргина

(72) Изобретатель: Дебабов В.Г.,
Воронин С.П., Козулин С.В., Синолицкий
М.К., Козулина Т.Н., Полянский А.Б., Синтин
А.А., Яненко А.С., Байбурдов Т.А., Хоркин
А.А., Луйксаар И.В., Решетникова
Л.В., Федченко Н.Н.

(73) Патентообладатель:

Государственное унитарное предприятие
Саратовский научно-исследовательский
институт биокатализа,
Саратовский филиал
Научно-исследовательского института химии и
технологии полимеров им.акад.В.А.Каргина

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АКРИЛАМИДА

(57) Реферат:

Использование: Биотехнология, получение
акриламида. Сущность изобретения: для
осуществления биотехнологического способа
получения акриламида биомассу штамма
Rhodococcus rhodochrous M33 ВКПМ-1268

суспандируют в водопроводной или
дистиллированной воде. Акрилонитрил
вносят в реакционный раствор по мере
трансформации так, чтобы его концентрация
исходная и в течение процесса не превышала
0,1%.

RU 2 077 588 C1

RU 2 077 588 C1



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 077 588** (13) **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **C 12 P 13/02**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 96100024/13, 16.01.1996

(46) Date of publication: 20.04.1997

(71) Applicant:
Gosudarstvennoe unitarnoe predpriatie
Saratovskij nauchno-issledovatel'skij
institut biokataliza,
Saratovskij filial
Nauchno-issledovatel'skogo instituta khimii
i tekhnologii polimerov im.akad.V.A.Kargina

(72) Inventor: Debabov V.G.,
Voronin S.P., Kozulin S.V., Sinolitskij
M.K., Kozulina T.N., Poljanskij A.B., Sintin
A.A., Janenko A.S., Bajburdov T.A., Khorkin
A.A., Lujksaar I.V., Reshetnikova
L.V., Fedchenko N.N.

(73) Proprietor:
Gosudarstvennoe unitarnoe predpriatie
Saratovskij nauchno-issledovatel'skij
institut biokataliza,
Saratovskij filial
Nauchno-issledovatel'skogo instituta khimii
i tekhnologii polimerov im.akad.V.A.Kargina

(54) **METHOD OF ACRYLAMIDE PREPARING**

(57) Abstract:
FIELD: biotechnology. SUBSTANCE:
biomass of the strain Rhodococcus
rhodochrous "M33BKПМ-1268" is suspended in
tap water or distilled water. Acrylonitrile

is added to reaction solution during its
metabolism and its initial concentration is
maintained at level 0.1%, not above. EFFECT
improved method of preparing.

RU 2 077 588 C1

RU 2 077 588 C1

Изобретение относится к биотехнологии и касается способа получения концентрированных водных растворов акриламида с использованием ферментной темы микроорганизма.

С развитием биотехнологии возрос интерес к возможностям микробного производства соединений, получаемых в химической промышленности традиционными методами тяжелого органического синтеза. К таким веществам относится акриламид, применяемый в крупнотоннажной химии для синтеза полимерных материалов, промышленное производство которого (химическое и микробиологическое) имеет целый ряд недостатков.

На сегодняшний день среди штаммов, способных осуществлять гидролиз алифатических и ароматических нитрилов в соответствующие амиды, наиболее полно изучены *Pseudomonas chlororaphis* B23, *Brevibacterium* sp. R312, *Rhodococcus* sp. N 774, *Rhodococcus rhodochrous* J1, *Rhodococcus rhodochrous* M8 и *Rhodococcus rhodochrous* M33. Это связано с наличием у данных культур максимальной нитрилгидратазной активности и их использованием в технологии получения амидов.

Микробиологическое получение акриламида в отличие от химических способов характеризуется мягкими условиями синтеза, селективностью реакции, высокой чистотой конечного продукта, отсутствием токсичных отходов.

Существует два подхода к осуществлению биотехнологического получения амидов: в периодическом режиме с использованием интактных клеток и непрерывном процессе на основе иммобилизованных бактерий, частично или высокоочищенного фермента.

Описанные технологии получения акриламида с использованием интактных клеток помимо преимуществ (простота в приготовлении биокатализатора, высокая ферментативная активность свободных клеток, стандартное оборудование, применяемое в химической промышленности) не лишены целого ряда недостатков. В частности, низкое содержание конечного продукта (акриламида) требует введения дополнительной стадии концентрирования, использование высоких микробных нагрузок затрудняет отделение клеток от реакционных растворов, может приводить к полимеризации растворов акриламида. Термолабильность фермента нитрилгидратазы большинства используемых штаммов требует поддержания температуры процесса в интервале 0-3°C, что ведет к дополнительным энергозатратам. Кроме того, внесение неорганических солей в реакционную смесь снижает качество конечного продукта.

Проведение процесса с использованием иммобилизованных клеток позволяет повысить стабильность катализатора и создать проточную систему работы установки. Однако сложности, связанные с подготовкой биокатализатора (иммобилизация клеток), необходимость контроля за разбуханием геля и вымыванием бактерий из гранул полиакриламида, отделение жидкой фазы от частиц катализатора по окончании процесса, периодическая полимеризация биокатализатора и оценка его

ферментативной активности, а также затруднение диффузионных процессов в полимерной частице делают эту технологию трудноосуществимой.

Важнейшими параметрами, характеризующими эффективность способа получения акриламида, является концентрация целевого продукта в растворе, концентрация биокатализатора и время проведения реакции.

Известен способ получения растворов акриламида с помощью штаммов N 774 и N 771 рода *Corynebacterium* и штамма N 775, относящегося к роду *Nocardia*. Процесс проводят в воде при pH 8,0, поддерживая заданное значение pH среды добавлением 0,5 N KOH, концентрации биокатализатора не менее 16 г/л, температура процесса около 0°C; за 16 ч получают 31% раствор акриламида.

Известен способ получения водных растворов акриламида с использованием бактерий *Pseudomonas chlororaphis* B 23. Процесс проводят с применением интактных клеток, создавая концентрацию биокатализатора в фосфатном буфере 10-20 г/л (здесь и далее по массе сухих клеток). Акрилонитрил вносят в реакционный раствор порциями по мере его трансформации. Температуру в растворе поддерживают в интервале 0-15°C. Через 7,5 ч выход акриламида составляет 400 г/л.

Известен способ получения акриламида с использованием микроорганизма *Rhodococcus rhodochrous* J1. Процесс проводят в 0,05M фосфатном буфере при температуре 0-5°C. В реакции используются интактные клетки в концентрации 10-20 г/л. Полученный раствор содержит 450 г/л акриламида.

К недостаткам вышеперечисленных способов можно отнести следующее: использование высоких микробных нагрузок (до 20 г/л) для достижения выхода акриламида 400-450 г/л, длительное время реакции и проведение процесса при низких температурах. Эти недостатки связаны с низкой нитрилгидратазной активностью и низкой термостабильностью биокатализатора.

Целью изобретения является получение растворов акриламида более высокой концентрации с использованием низких микробных нагрузок и сокращение времени процесса.

Поставленная цель достигается путем использования в качестве биокатализатора биомассы штамма *Rhodococcus rhodochrous* M33 ВКПМ S-1268, созданием исходной и поддержанием текущей концентраций акрилонитрила в реакционной среде не выше 0,1%.

Предлагаемый способ осуществляется следующим образом.

Клетки штамма M33 выращивают на питательной среде следующего состава, г/л: K_2HPO_4 0,5; KH_2PO_4 0,6; $MgSO_4$ $FeSO_4$ 0,005; $CoCl_2$ 0,01; глюкоза 10-20; мочевины 5-10 (либо $NaNO_3$ 1).

Биомассу отделяют любым известным способом и суспендируют в водопроводной или дистиллированной воде в количестве 0,64-4,1 г/л в интервале pH 6,8-7,8. Акрилонитрил вносят в реакционный раствор по мере трансформации так, чтобы его

начальная и текущая концентрация не превышала 0,1%. Процесс проводят при постоянном перемешивании, поддерживая температуру реакции в интервале от 13 до 22 °С. Время реакции 4-6 ч. По окончании процесса получают растворы с концентрацией акриламида 500-600 г/л.

Сопоставительный анализ заявляемого решения с прототипом показывает, что предлагаемый способ отличается тем, что в качестве биокатализатора используется биомасса штамма *Rhodococcus rhodochrous* M33 ВКПМ S-1268, а акрилонитрил вносят в реакционный раствор так, чтобы его концентрация, исходная и поддерживаемая в ходе реакции, не превышала 0,1%. Это позволяет избежать значительного угнетения нитрилгидратазной активности, имеющего место при осуществлении способа, описанного в прототипе. В свою очередь сохранение высокой нитрилгидратазной активности на протяжении всей реакции позволяет получать растворы акриламида с концентрацией до 600 г/л, используя минимальные микробные нагрузки, и сократить время проведения процесса до 4-6 ч.

Способ поясняется следующими примерами.

Пример 1. В три стальных реактора объемом 1,5 л каждый, снабженных механическими мешалками, термостатируемых в интервале температур 12-20 °С, вносят по 627 мл дистиллированной воды (рН 7,6). В каждом реакторе ресуспендируют 426 мг клеток (по сухой массе) штамма *Rhodococcus rhodochrous* M33 с активностью нитрилгидратазы 210 ед. Затем в первый реактор добавляют 12 г чистого акрилонитрила и по мере трансформации поддерживают его концентрацию в интервале 1-2%. Во второй реактор акрилонитрил вносят так, чтобы его концентрация в растворе находилась в интервале 0,1- 2%. В третий реактор акрилонитрил вносят так, чтобы его концентрация в растворе не превышала 0,1%. Качественный и количественный состав раствора определяют по данным газожидкостной хроматографии. Реакцию останавливают через 8 ч после резкого падения скорости гидролиза акрилонитрила. В первом реакторе получают 42%-ный раствор акриламида, во втором 43%-ный раствор, в третьем 48%-ный раствор.

Результаты эксперимента показывают, что при проведении реакции с поддержанием концентрации акрилонитрила в интервале 1-2% можно получить только 42%-ный раствор акриламида. Уменьшение концентрации акрилонитрила в реакционном растворе до 0,1% и ниже приводит к увеличению выхода акриламида до 48%.

Пример 2. В стальной реактор объемом 3 л, снабженный механической мешалкой, термостатируемый в интервале температур 20-22 °С, вносят 2 л водопроводной воды, содержащей 1,27 г клеток штамма

Rhodococcus rhodochrous M33 с активностью нитрилгидратазы 210 ед. Акрилонитрил вносят в реакционный раствор по мере трансформации так, чтобы его концентрация, начальная и текущая, не превышала 0,1%. Качественный и количественный состав раствора определяют по данным газожидкостной хроматографии. За 6 ч реакции получают раствор акриламида с концентрацией 500 г/л. Далее реакцию останавливают из-за резкого падения скорости гидролиза акрилонитрила. Выход акриламида близок к количественному, акриловая кислота в качестве побочного продукта не обнаруживается.

Пример 3. В стальной реактор объемом 3 л, снабженный механической мешалкой, термостатируемый в интервале температур 13-20 °С, вносят 1,5 л водопроводной воды, содержащей 3,0 г клеток штамма *Rhodococcus rhodochrous* M33 с активностью нитрилгидратазы 210 ед. Акрилонитрил вносят в реакционный раствор по мере трансформации так, чтобы его концентрация не превышала 0,1%. Качественный и количественный состав раствора определяют по данным газожидкостной хроматографии. За 6 ч реакции получают раствор акриламида с концентрацией 570 г/л.

Пример 4. В стальной реактор объемом 3 л, снабженный механической мешалкой, термостатируемый в интервале температур 13-20 °С, вносят 1,5 л водопроводной воды, содержащей 6,15 г клеток штамма *Rhodococcus rhodochrous* M33 с активностью нитрилгидратазы 210 ед. Акрилонитрил вносят в реакционный раствор по мере трансформации так, чтобы его концентрация не превышала 0,1%. Качественный и количественный состав раствора определяют по данным газожидкостной хроматографии. За 4 ч реакции получают раствор акриламида с концентрацией 600 г/л.

Таким образом, заявляемый способ получения акриламида обладает следующими отличиями: использованием в качестве биокатализатора биомассы штамма *Rhodococcus rhodochrous* M33 ВКПМ S-1268 и поддержанием концентрации акрилонитрила (исходной и в течении гидролиза) не более 0,1%. Это позволяет получать растворы акриламида с концентрацией до 600 г/л, используя в реакции низкие микробные нагрузки и сократить время проведения процесса до 4-6 ч.

Формула изобретения:

1 Способ получения акриламида путем гидратации акрилонитрила с использованием биомассы бактерий *Rhodococcus rhodochrous*, обладающей нитрилгидратазной активностью, с последующим выделением целевого продукта, отличающийся тем, что гидратацию проводят с использованием биомассы штамма *Rhodococcus rhodochrous* M33 ВКПМ 1268 при исходной концентрации акрилонитрила не более 0,1% и поддерживают ее на этом уровне в течение всего процесса